



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: FAH 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进胶质母细胞瘤进展
作者: 李式浩, 赵兵, 杨铁牛, 杨金亮, 张永亮, 李仲森, 李顺利, 陈宁, 王建标, 李佳, 马庆防
网络首发日期: 2026-03-11
引用格式: 李式浩, 赵兵, 杨铁牛, 杨金亮, 张永亮, 李仲森, 李顺利, 陈宁, 王建标, 李佳, 马庆防. FAH 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进胶质母细胞瘤进展[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260311.1347.004>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

FAH通过激活PI3K/AKT/mTOR信号通路促进胶质母细胞瘤进展

李式浩¹, 赵兵², 杨铁牛¹, 杨金亮¹, 张永亮¹, 李仲森¹, 李顺利¹, 陈宁¹, 王建标¹,
李佳¹, 马庆防¹

(¹安徽医科大学附属阜阳医院神经外科, 阜阳 236000; ²安徽医科大学第二附属医院神经外科, 合肥 230601)

摘要 **目的** 探讨延胡索酰乙酰乙酸水解酶 (FAH) 在胶质母细胞瘤 (GBM) 进展中的作用及其潜在分子机制。**方法** 对癌症基因组图谱(TCGA)-GBM、GSE4290 和 GSE116520 数据集进行差异表达分析。应用加权基因共表达网络分析 (WGCNA) 识别关键模块, 并采用 Cox 回归和风险模型筛选预后基因。利用单细胞 RNA 测序集对预后基因进行免疫浸润分析。TCGA 和人类蛋白质图谱 (HPA) 数据库中分析 FAH 在 GBM 中的临床表达特征。体内外实验验证 FAH 的功能作用, 并进行通路分析以探究潜在机制。**结果** 在 3 个 GBM 数据集中共鉴定出 152 个交集基因 ($P < 0.05$)。WGCNA 显示, 绿松石色模块与肿瘤纯度、基质评分、免疫评分和 ESTIMATE 评分关联最为密切 ($P < 0.001$)。与正常组织相比, 3 个预后基因 (CTSD、FAH、THBD) 在 GBM 中均表达上调, 且与免疫浸润相关 ($P < 0.05$)。与正常组织相比, GBM 组织中 FAH 的 mRNA 和蛋白表达升高, 并且 FAH 与年龄分层和 TP53 突变显著相关 ($P < 0.05$)。CCK-8 实验实验结果显示, 与 shNC 组相比, shFAH 组 GBM 细胞的增殖活性降低 ($P < 0.001$)。Transwell 迁移和侵袭实验结果显示, 与 shNC 组相比, shFAH 组细胞的迁移和侵袭数量下降 ($P < 0.05$)。Western blot 检测结果显示, 与 shNC 组相比, shFAH 组中 PI3K、p-AKT 和 p-mTOR 蛋白表达水平减少 ($P < 0.05$)。体内皮下成瘤实验进一步证实, 与 shNC 组相比, shFAH 组小鼠肿瘤体积和重量均降低 ($P < 0.001$)。**结论** FAH 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进 GBM 进展, 可作为 GBM 的潜在治疗靶点。

关键词 胶质母细胞瘤; PI3K/AKT/mTOR 信号通路; FAH; 肿瘤微环境; 预后; 肿瘤进展

中图分类号 R 739.4

文献标志码 A

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (编号: 1908085MH284)

作者简介: 李式浩, 男, 主治医师;

马庆防, 男, 硕士, 主任医师, 通信作者, E-mail: mqfdoctor@163.com ;

李佳, 男, 硕士, 副主任医师, 通信作者, E-mail: 94138282@qq.com

***FAH* promotes glioblastoma progression by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway**

Li Shihao¹, Zhao Bing², Yang Tieniu¹, Yang Jinliang¹, Zhang Yongliang¹, Li Zhongsen¹,
Li Shunli¹, Chen Ning¹, Wang Jianbiao¹, Li Jia¹, Ma Qingfang¹

¹*Dept of Neurosurgery, Affiliated Fuyang Hospital of Anhui Medical University, Fuyang 236000;*

²*Dept of Neurosurgery, the Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)*

Abstract Objective To investigate the functional role and underlying molecular mechanisms of fumarylacetoacetate hydrolase (*FAH*) in the progression of glioblastoma (GBM). **Methods** Differential expression analysis was performed on the TCGA-GBM, GSE4290, and GSE116520 datasets. Weighted gene co-expression network analysis (WGCNA) was used to identify key modules, and Cox regression and risk modeling were used to screen prognostic genes. Immune infiltration analysis of prognostic genes was carried out by using single-cell RNA sequencing panels. The clinical expression signature of *FAH* in GBM was analyzed in the TCGA and HPA databases. The functional role of *FAH* was validated by *in vitro* and *in vivo* experiments, and pathway analysis was performed to explore the underlying mechanisms. **Results** A total of 152 overlapping genes were identified across the three GBM datasets. WGCNA revealed that the turquoise module was most strongly associated with tumor purity, stromal score, immune score, and ESTIMATE score ($P < 0.001$). Compared with normal tissues, three prognostic genes (*CTSD*, *FAH*, and *THBD*) were upregulated in GBM and correlated with immune infiltration ($P < 0.05$). *FAH* mRNA and protein levels were elevated in GBM tissues relative to normal tissues, and its expression was significantly associated with age stratification and TP53 mutation ($P < 0.05$). CCK-8 assay results showed that, compared with the shNC group, the proliferative activity of GBM cells in the sh*FAH* group was reduced ($P < 0.001$). Transwell migration and invasion assays demonstrated that, relative to the shNC group, the numbers of migrated and invaded cells in the sh*FAH* group decreased ($P < 0.05$). Western blot analysis revealed that the protein expression levels of PI3K, p-AKT, and p-mTOR in the sh*FAH* group decreased compared with those in the shNC group ($P < 0.05$). *In vivo* subcutaneous xenograft experiments further confirmed that tumor volume and weight significantly decreased in the sh*FAH* group compared with the shNC group ($P < 0.001$). **Conclusion** *FAH* promotes GBM progression by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and may serve as a potential therapeutic target for GBM.

Key words glioblastoma; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway; *FAH*; tumor microenvironment; prognosis; tumor progression

Fund program Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 1908085MH284)

Corresponding authors Ma Qingfang, E-mail: mqfdoctor@163.com; Li Jia, E-mail: 94138282@qq.com

胶质母细胞瘤 (glioblastoma, GBM) 是中枢神经系统恶性程度最高的星形细胞肿瘤, 具有生长迅速、侵袭性强、预后差的特点^[1]。GBM 的临床表现通常包括头痛, 并常伴有颅内压增高症状, 部分患者还会出现癫痫发作^[2]。I型神经纤维瘤病、Li-Fraumeni 综合征等遗传病已经被确认为是 GBM 的潜在遗传风险因素。此外, 长期接触电离辐射和致癌化学物质可能会进一步增加罹患 GBM 的风险^[3]。然而, GBM 的发生发展不仅与遗传和环境因素相关, 还受到多种分子信号通路的驱动。

PI3K/AKT/mTOR 信号通路被认为是 GBM 一个重要的调控机制, 该通路的失调会导致细胞生长、增殖、存活和代谢重编程失控, 从而加速肿瘤进展^[4]。肿瘤免疫微环境 (tumor immune microenvironment, TME) 在 GBM 进展中发挥重要作用, 其与免疫细胞的相互作用不仅促进肿瘤生长, 还会影响治疗耐药性^[5]。由此, 免疫相关基因可能成为 GBM 潜在的治疗靶点。该研究旨在通过综合生物信息学分析识别 GBM 中关键的预后免疫相关基因, 并重点探讨 *FAH* 在 GBM 细胞表型的功能作用及其潜在的分子机制, 尤其关注其在 PI3K/AKT/mTOR 信号通路中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 GBM 数据集的下载和差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs) 的筛选 从癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 下载 153 例 GBM 样本和 5 例对照样本。从 GEO 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 检索了 2 个 GBM 相关数据集, 分别是 GSE116520 (GBM17 例和对照 8 例) 和 GSE4290 (GBM77 例和对照 23 例)。用 R 语言中的“limma”包识别 DEGs, 选择对数倍数变化 (fold change, FC) >1.3 和 $P < 0.05$ 作为上调 DEGs 的筛选标准, $FC < 0.77$ 和 $P < 0.05$ 作为下调 DEGs 的筛选标准^[6]。微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 分别对 3 个数据集中的上调表达基因和下调表达基因进行交集分析, 确定交集基因。

1.2 试剂与仪器 人 GBM 细胞株 U87、T98G、HS683 和 U251 (货号: CL-0238、CL-0583、CL-0362 和 CL-0237) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。另外 2 个 GBM 细胞株 SHG44

(货号: YS2373C) 和正常人星形胶质细胞 NHA (货号: YS2144C) 购自上海雅吉生物科技有限公司。DMEM 培养基 (货号: C2707)、胎牛血清 (FBS, 货号: C0251)、TRIzol 试剂 (货号: R0016)、RIPA 裂解液 (货号: P0039)、PVDF 膜 (货号: FFP22)、Matrigel (货号: C0376)、结晶紫染色液 (货号: Y268091-100g)、BCA 蛋白检测试剂盒 (货号: P0012)、SDS-PAGE 胶 (货号: P0057A)、聚凝胺 (Polybrene, 货号: C0351)、嘌呤霉素 (Puromycin, 货号: ST551-10mg)、酶标仪 (货号: E0228)、4%多聚甲醛 (货号: P0099)、CCK-8 试剂盒 (货号: C0038)、ECL 化学发光试剂盒 (货号: P0018AS)、抗 p-PI3K (货号: AA329, 1:1 000) 和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗 (货号: A0208, 1:1 000) 均由上海碧云天生物技术有限公司提供; PrimeScript RT 试剂盒 (货号: RR037A) 和 SYBR Green 预混液 (货号: RR820A) 购自日本 Takara Bio 公司; Transwell 小室 (货号: 3422) 购自美国 Corning 公司; 抗 FAH (货号: 14928-1-AP, 1:2 000)、抗 PI3K (货号: 20584-1-AP, 1:1 000)、抗 p-AKT (货号: 80455-1-RR, 1:4 000)、抗 AKT (货号: 10176-2-AP, 1:2 000)、抗 p-4EBP1 (货号: 81812-4-RR, 1:1 000)、抗 4EBP1 (货号: 13988-1-AP, 1:1 000)、抗 p-S6 (货号: 29223-1-AP, 1:4 000)、抗 S6 (货号: 80208-1-RR, 1:5 000) 和抗 GAPDH (货号: 10494-1-AP, 1:5 000) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 携带 *FAH* shRNA 的慢病毒载体 (sh*FAH*) 及阴性对照 (shNC) 购自上海 GenePharma 公司; QuantStudio™ 6 Flex 实时荧光定量 PCR 系统 (货号: 4485692) 购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.3 加权基因共表达网络分析 (weighted gene co-expression network analysis, WGCNA) 使用 R 语言的“WGCNA”包, 对从 TCGA-GBM、GSE4290 和 GSE116520 数据集中鉴定出的交集基因进行 WGCNA。软阈值设置为 6, 以确保无标度拓扑结构。基于拓扑重叠矩阵 (topological overlap matrix, TOM), 采用平均链接层次聚类法对基因进行聚类, 并使用动态树切割算法识别模块。然后, 使用 ESTIMATE 算法 (R 包“estimate”) 计算模块特征基因 (module eigengene, ME) 与肿瘤纯度 (tumor purity)、基质评分 (stromal score)、免疫评分 (immune score) 和 ESTIMATE 评分 (ESTIMATE score)。与肿瘤微环境 (tumor immune microenvironment, TME) 相关性最强的模块被认为是进一步功能富集分析的关键模块。

1.4 功能富集分析 使用 Enrichr 数据库 (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/>) 对 WGCNA 识别的绿松石模块中的基因进行基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析, 包括生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular

function, MF)。同时,还进行了京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路分析,以识别显著富集的通路。使用 R 语言包“ggplot2”生成条形图和气泡图对结果进行可视化。

1.5 预后模型构建与生存分析 对 TCGA-GBM 数据集中的 61 个关键基因进行单变量 Cox 回归分析,利用“forestplot”包绘制森林图,计算每个变量的 P 值、风险比(hazard ratios, HR)和 95%置信区间(confidence interval, CI),以评估其与总生存的关联。进一步使用 GEPIA 2 数据库(<http://gepia2.cancer-pku.cn/>)验证了关键预后相关基因的表达谱。使用 R 语言中的“glmnet”包进行最小绝对收缩和选择算子(least absolute shrinkage and selection operato, LASSO)回归分析,其中惩罚参数(λ)通过基于最小偏似然偏差的 10 倍交叉验证确定。根据中位风险评分将患者分为高风险组和低风险组。采用 Kaplan-Meier 生存分析比较两个风险组的总生存率(overall survival, OS),计算 HR 及 95% CI ,对数秩检验 P 值评估统计学意义。使用 R 语言中的“timeROC”包进行 1、3 年的受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线分析,并计算曲线下面积(under the curve, AUC)。

1.6 单细胞 RNA 测序(scRNA-seq)分析 从肿瘤免疫单细胞中心(tumor immunity single cell center, TISCH)数据库(<http://tisch.comp-genomics.org/>)获取了 3 个 scRNA-seq 数据集(GSE131928、GSE139448 和 GSE162631)。经过质量控制和标准化后,使用 R 语言中的“Seurat”包进行细胞聚类和注释。使用 UMAP 特征图和“Seurat/ggplot2”生成的小提琴图可视化 *CTSD*、*FAH* 和 *THBD* 在不同细胞类型中的表达模式。

1.7 免疫浸润分析 使用 TIMER 数据库(<http://timer.cistrome.org/>)进一步分析 GBM 中预后相关基因表达与免疫细胞浸润之间的相关性。检测 *CTSD*、*FAH* 和 *THBD* 的表达水平与肿瘤纯度(tumor purity)、B 细胞、 $CD8^+$ T 细胞($CD8^+$ T cell)、 $CD4^+$ T 细胞($CD4^+$ T cell)、巨噬细胞(macrophage)、中性粒细胞(neutrophil)和树突状细胞(dendritic cell)的相关性。

1.8 FAH 的表达分析和免疫组化(immunohistochemistry, IHC) 使用来自 TCGA-GBM 队列的 RNA 测序数据,分析了 GBM 和正常脑组织中 *FAH* 的表达。对每百万转录本(transcripts per million, TPM)值进行 $\log_2(TPM+1)$ 转换以进行比较。根据样本类型(正常 vs 原发性肿瘤)、患者年龄(21~40、41~60、61~80 和 >80 岁)、性别(男性 vs 女性)和 TP53 突变状态(突变 vs 非突变)进行亚组分析。为了进一步验证 *FAH* 蛋白的表达,基于人类蛋白质图谱(HPA, <https://www.proteinatlas.org/>)中提供的抗 *FAH* 抗体对正常脑组织和 GBM 组织进行 IHC 分析。根据染色强度和阳性细胞比例比较正常组织和肿瘤组织中的蛋

白质表达水平。

1.9 基因集富集与相关性分析 使用单样本基因集富集分析 (ssGSEA) 评估 *FAH* 表达与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路之间的相关性。通路基因集来自分子特征数据库 (MSigDB)。从 TCGA-GBM 转录组数据中提取 *FAH* 表达水平, 并将其标准化为 TPM。进行皮尔逊相关性分析以评估 *FAH* 表达与通路富集评分之间的关联。计算相关系数 r 和 P 值, 并使用 R 语言的“GSVA”和“ggplot2”生成拟合回归线的散点图。

1.10 细胞系来源和培养 人 GBM 细胞株 (U87、T98G、U251、SHG44、HS683) 和正常人星形胶质细胞 (NHA) 放置在添加 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的湿润环境中培养。

1.11 基因沉默实验 将携带 *FAH* shRNA 的慢病毒载体 (sh*FAH*) 及阴性对照 (shNC) 感染 U87 和 T98G 细胞。在 polybrene (8 $\mu\text{g/mL}$) 存在下增强感染效率, 使用嘌呤霉素 (2 $\mu\text{g/mL}$) 筛选 7 d, 建立稳定的 *FAH* 沉默细胞系。

1.12 RNA 提取及定量实时 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 实验 使用 TRIzol 试剂提取总 RNA, 并使用 PrimeScript RT 试剂盒进行逆转录。使用 SYBR Green 预混液在 QuantStudio™ 6 Flex 实时 PCR 系统上进行 qPCR。循环条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s, 随后 40 个循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s), 并进行熔解曲线分析以确认引物特异性。以 *GAPDH* 作为内参, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算相对表达量。*FAH* 正向引物 5'-CTCTCCGCACGCCACCTTAG-3', 反向引物 5'-GCCAATGGCCACACCTATCC-3'。*GAPDH* 正向引物 5'-CTAGCTGGCCCGATTCTCC-3', 反向引物 5'-ATGGAATTTGCCATGGGTGG-3'。

1.13 Western blot 实验 使用添加了蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白。使用 BCA 蛋白测定试剂盒测定蛋白浓度。取等量的蛋白, 经 10% SDS-PAGE 电泳分离, 并转移至 PVDF 膜上。用 5% 脱脂牛奶封闭后, 将膜与以下一抗 (抗 *FAH*、抗 p-PI3K、抗 PI3K、抗 p-AKT、抗 AKT、抗 p-4EBP1、抗 4EBP1、抗 p-S6、抗 S6、抗 *GAPDH*) 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。接着使用二抗 (HRP 偶联抗兔抗体) 在室温下孵育 1 h。使用 ECL 化学发光试剂盒对蛋白条带进行可视化, 并使用 ImageJ 软件进行定量分析。

1.14 细胞增殖检测 使用 CCK-8 试剂盒测量细胞增殖。将 U87 和 T98G 细胞 (2×10^3 细胞/孔) 接种于 96 孔板中。在指定时间点 (第 1~5 天), 向每个孔中加入 10 μL CCK-8 溶液, 并在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度。

1.15 细胞迁移和侵袭检测 使用 Transwell 小室 (孔径 8 μm) 评估细胞侵袭和迁移。侵袭实验中, 上室预包被 Matrigel, 迁移实验中则无需 Matrigel。将 5×10^4 细胞接种于无血清培

培养基中，并将含 10% FBS 的培养基加入下室作为趋化剂。24 h 后，迁移或侵袭至下室表面的细胞用 4% 多聚甲醛固定，0.1% 结晶紫染色，并在显微镜下计数。

1.16 肿瘤异种移植模型 雌性 BALB/c 裸鼠（4~6 周龄，18~20 g）购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司。将稳定转染 shNC 或 shFAH 的 U87 细胞（ 5×10^6 ）皮下注射至小鼠侧腹（每组 6 只）。每 3 d 用卡尺测量一次肿瘤大小，肿瘤体积计算公式为（长 \times 宽²）/2。28 d 后，采用二氧化碳吸入法处死小鼠，然后进行颈椎脱位，切除肿瘤，称重并拍照。所有动物实验均已获得安徽医科大学动物护理和使用委员会的批准（批准号：LLSC20230730）。

1.17 统计学处理 所有统计学分析均使用 GraphPad Prism 8.0 和 R 软件（版本 4.0.3）进行。数据以至少 3 次独立实验的平均值 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示。两组间差异采用 Student's *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析（ANOVA）和 Tukey 事后检验。生存曲线采用 Kaplan-Meier 方法绘制，并采用对数秩检验进行比较。*HR* 和 95%*CI* 采用单因素和多因素 Cox 回归分析计算。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GBM 中免疫相关基因的鉴定和功能富集分析 对 3 个 GBM 相关数据集（TCGA-GBM、GSE4290 和 GSE116520）进行了差异表达分析。火山图显示，每个数据集中均存在大量显著上调和下调的基因（图 1A-1C）。其中，TCGA-GBM 数据集中有 5 434 个基因上调，3 824 个基因下调（图 1A）；GSE4290 数据集中有 2 241 个基因上调，1 200 个基因下调（图 1B）；GSE116520 数据集中有 1 633 个基因上调，1 189 个基因下调（图 1C）。维恩图分析显示，在 3 个数据集中鉴定出 146 个重叠下调基因和 6 个重叠上调基因（图 1D、1E）。进一步基于 WGCNA 研究 GBM 相关基因的共表达模式。设定软阈值幂为 6，以保证网络符合无尺度拓扑结构（图 2A）。层次聚类分析识别出 2 个基因模块，灰色模块为未分配基因，不纳入后续 G 通路分析表明这些基因还在趋化因子信号转导、造血细胞谱系通路等通路中显著富集（图 3D）。

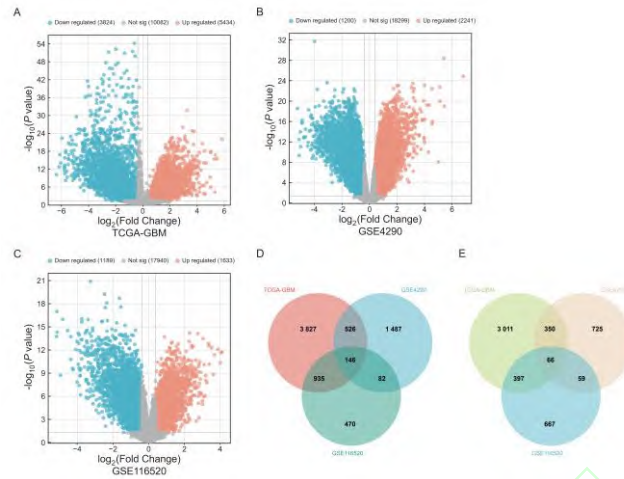


图 1 3 个 GBM 数据集中的 DEGs

Fig.1 Differentially expressed genes in three GBM datasets

A: Volcano plot of the TCGA-GBM dataset; Red dots indicate upregulated genes, blue dots indicate downregulated genes, and gray dots indicate non-significant genes; B: Volcano plot of the GSE4290 dataset; C: Volcano plot of the GSE116520 dataset; D: Venn diagram showing overlapping upregulated genes in three datasets; E: Venn diagram showing overlapping downregulated genes in three datasets.

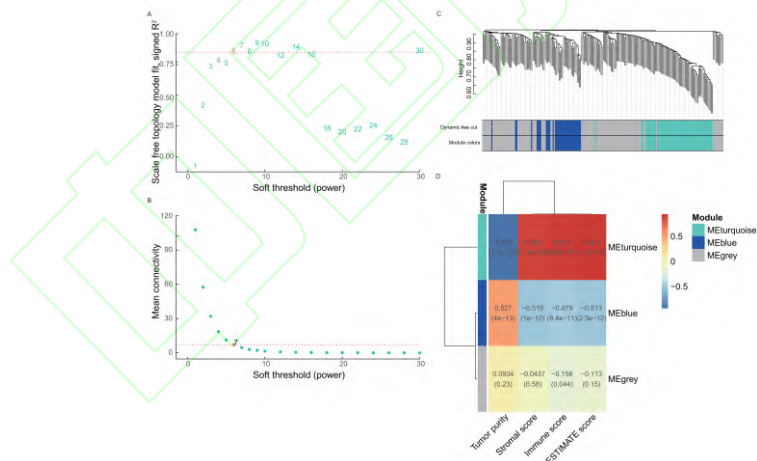


图 2 3 个 GBM 数据集中交集基因的加权基因共表达网络分析

Fig.2 Weighted gene co-expression network analysis of the intersection genes in three GBM datasets

A: Scale-free topological fit index at different soft-threshold powers; B: Mean connectivity at different soft-threshold powers; The threshold power was selected as 6; C: Gene dendrogram and module assignment determined by dynamic tree cutting; D: Heatmap of module-trait relationships.

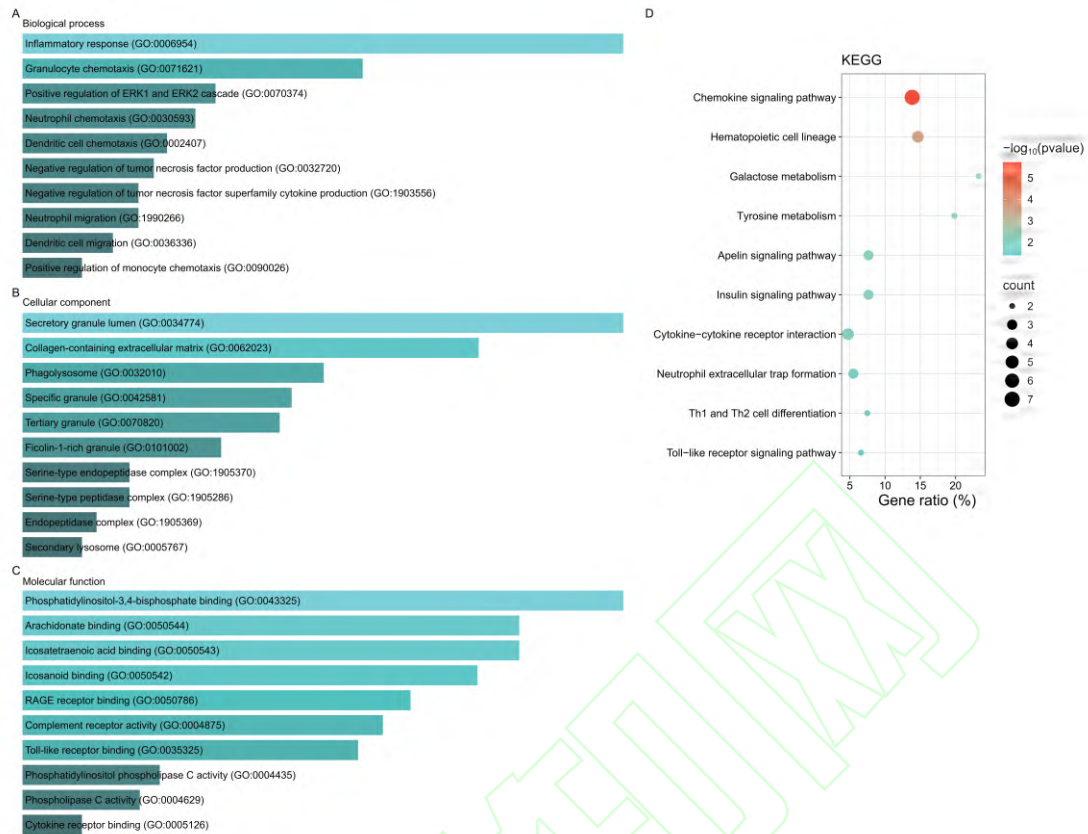


图 3 绿松石模块中 61 个基因的功能富集分析

Fig.3 Functional enrichment analysis of the 61 genes in the turquoise module

A-C: Gene Ontology enrichment of the 61 genes in the three categories of biological process, cellular component, and molecular function; D: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway enrichment analysis; The dot size represents the number of genes, and the color intensity indicates the significance level.

2.2 GBM 中预后关键基因的鉴定 采用单因素 Cox 回归分析对绿松石模块中的 61 个基因进行单因素 Cox 分析, 结果显示, 5 个基因 (*HK3TH*、*BD*、*CTSD*、*FAH* 和 *FCN3*) 的预后结果较为显著 ($HR > 1$) (图 4A)。GEPIA 数据库分析显示, *CTSD*、*FAH*、*HK3* 和 *THBD* 在 GBMy 样本中上调 ($P < 0.05$), 而 *FCN3* 的表达差异无统计学意义 (图 4B-4F)。进一步对这 4 个预后基因进行 LASSO Cox 回归分析, 根据 λ 最小值 ($\lambda_{min}=0.0517$), 建立基于 $Riskscore = (0.0046) \times THBD + (0.4169) \times CTSD + (0.0822) \times FAH$ 的预后风险模型 (图 5A、5B)。根据中位风险评分, 患者被分为高风险组和低风险组。风险评分和生存状态的分布显示, 两组之间存在差异 ($P = 0.00162$), 且高风险组中这 3 个基因的表达水平更高 (图 5C)。在生存分析中, 高风险组患者的总生存期短于低风险组患者 ($HR = 1.79$, $P = 0.00162$; 图 5D)。ROC 曲线分析证实了该模型的预测准确性, 1 年生存率的 AUC 值

0.725, 3年生存率的AUC值为0.698(图5E)。

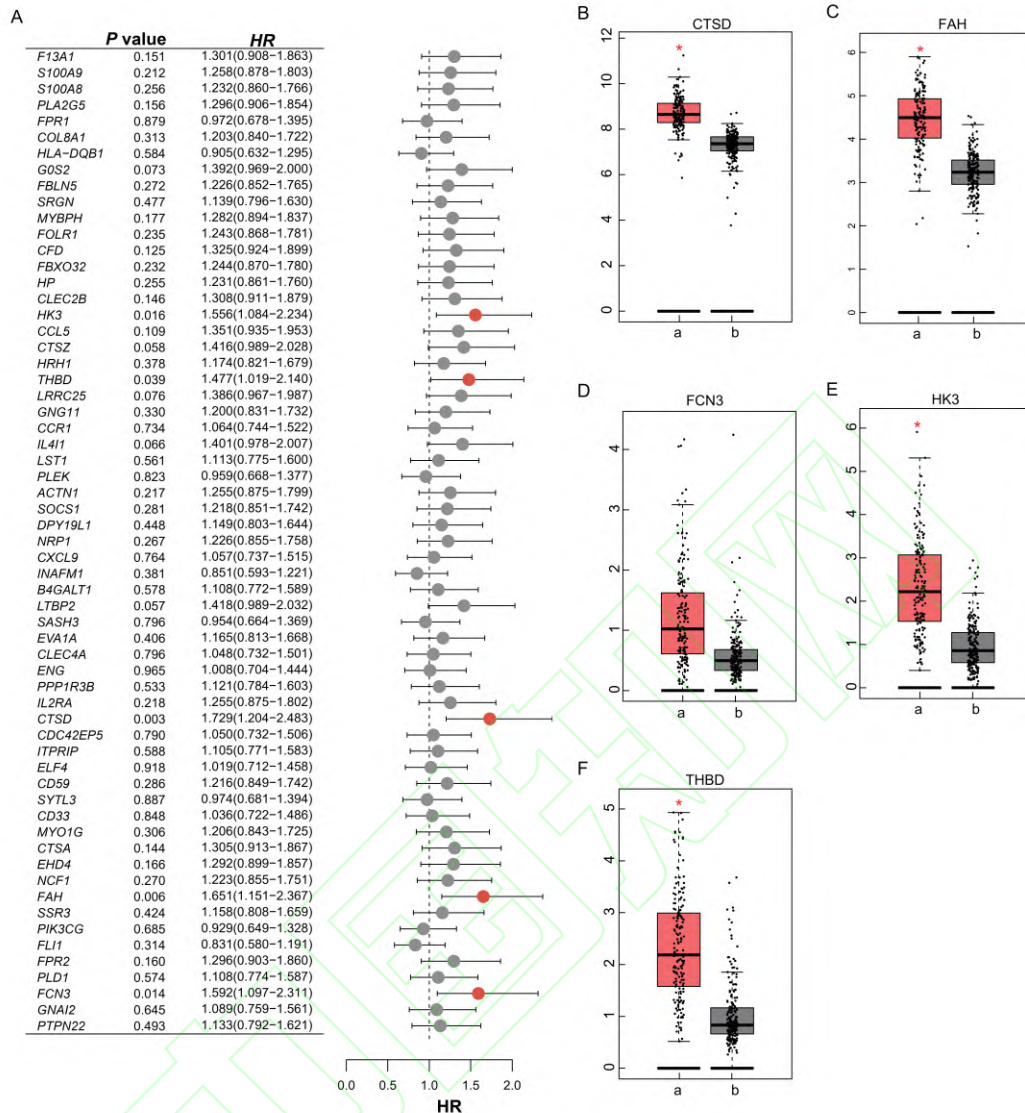


图4 GBM中候选基因的预后分析和表达验证

Fig.4 Prognostic analysis and expression validation of candidate genes in GBM

A: Forest plot of univariate Cox regression analysis showing the *P* values, hazard ratios (HRs), and 95% confidence intervals (CIs) for candidate genes; B-F: Expression levels of *CTSD*, *FAH*, *FCN3*, *HK3*, and *THBD* in GBM samples (*n*=163) and normal samples (*n*=207) using the GEPIA database; a: GBM; b: NOR; **P*<0.05 vs normal samples.

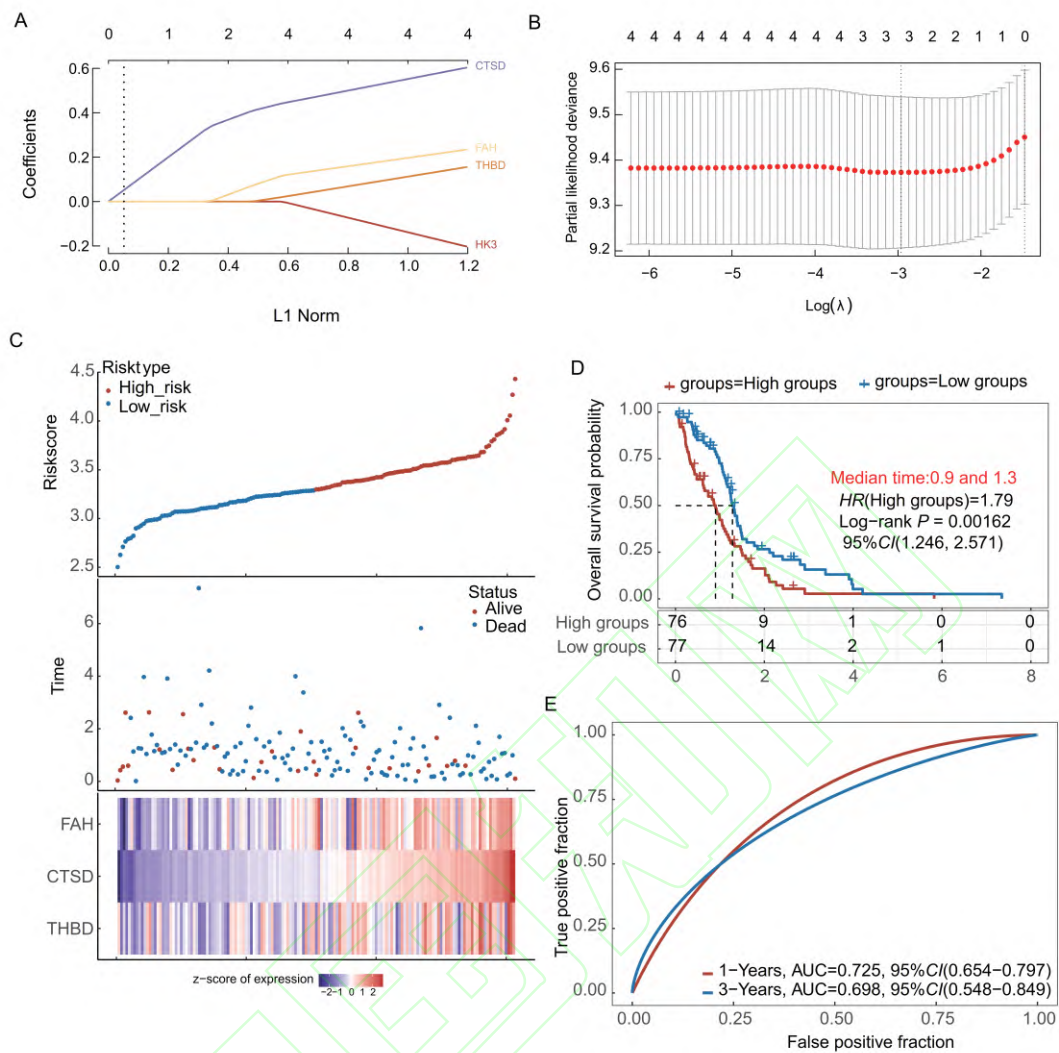


图 5 GBM 预后风险模型的构建

Fig.5 Construction of a prognostic risk model for GBM

A: LASSO regression coefficient curves for candidate prognostic genes; B: Ten-fold cross-validation was used to select the optimal penalty parameter (λ) in the LASSO Cox regression mode; C: Risk score distribution, survival status, and expression heatmap for the three genes (*FAH*, *HK3*, and *THBD*); D: Kaplan-Meier survival analysis of overall survival in high-risk and low-risk groups; E: Time-dependent receiver operating characteristic (ROC) curves assessing the predictive performance of the risk model for 1- and 3-year overall survival.

2.3 GBM 微环境中预后基因的表达模式 对 TISCH 数据库的 3 个与 GBM 相关的单细胞 RNA 测序数据集 GSE131928、GSE139448 和 GSE162631 进行分析，以评估肿瘤微环境 (tumor microenvironment, TME) 中 *CTSD*、*FAH* 和 *THBD* 的表达情况。在包含 8 种主要细胞类型的 GSE131928 数据集中，*CTSD*、*FAH* 和 *THBD* 在这些细胞类型中均有表达 (图

6A)。在包含 4 种细胞类型的 GSE139448 数据集中，*CTSD* 和 *FAH* 主要在恶性细胞和免疫细胞中富集，而 *THBD* 的表达相对较弱（图 6B）。在包含 5 种主要细胞类型的 GSE162631 数据集中，*CTSD*、*FAH* 和 *THBD* 均在恶性细胞和免疫细胞群中表达（图 6C）。图 7 进一步展示了 3 个数据集中这些基因在不同细胞类型中的水平。*CTSD* 在一些恶性细胞和巨噬细胞簇中持续高表达，*FAH* 在单核/巨噬细胞、肥大细胞中高表达，而 *THBD* 则主要在内皮细胞和单核/巨噬细胞中富集。

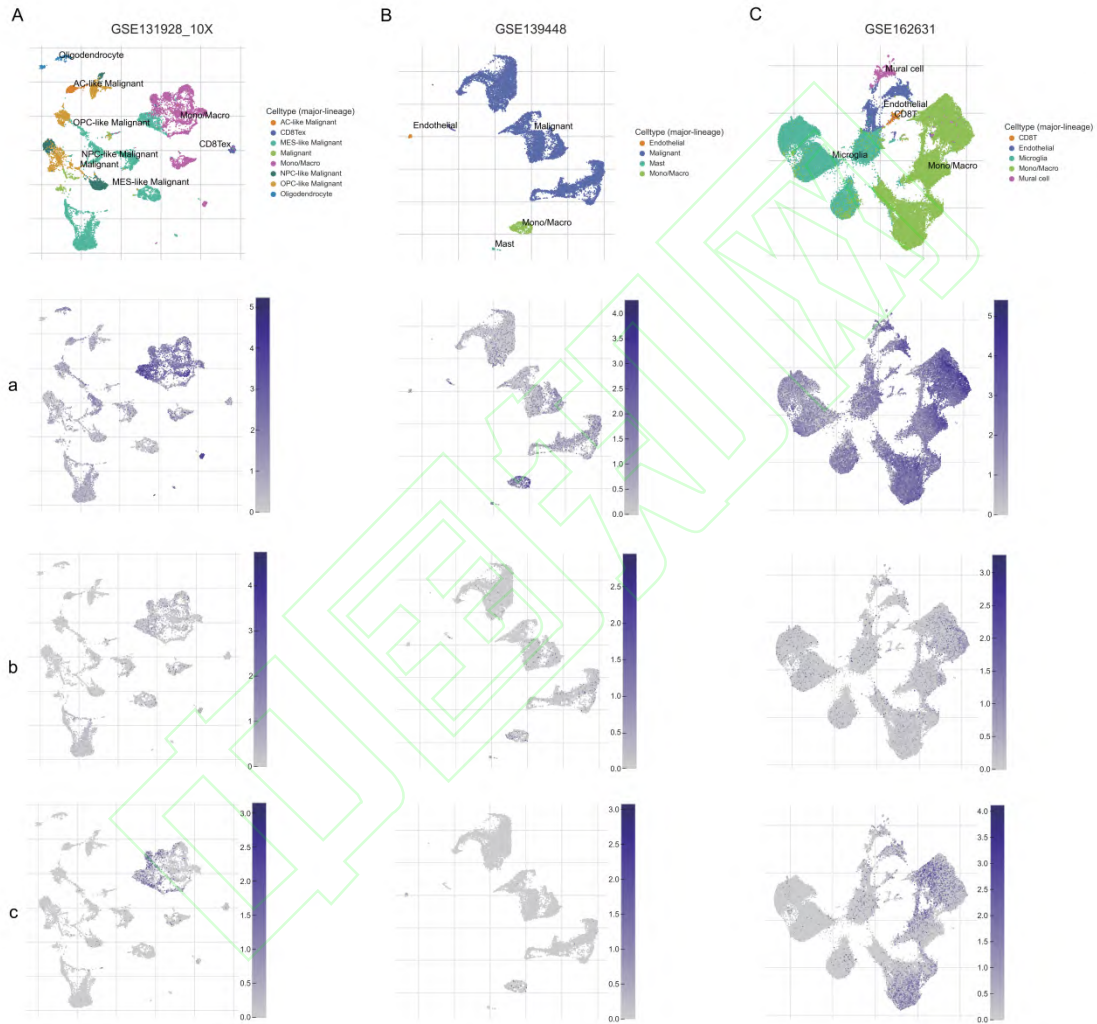


图 6 GBM 微环境中预后基因的表达模式

Fig.6 Expression patterns of prognostic genes in the GBM microenvironment

A: UMAP plots showing the expression distribution of *CTSD*, *FAH*, and *THBD* across eight major cell types from the GSE131928 dataset; B: UMAP plots of four major cell types in the GSE139448 dataset and the expression patterns of *CTSD*, *FAH*, and *THBD* across different cell types; C: UMAP plots of five major cell types in the GSE162631 dataset and the expression of *CTSD*, *FAH*, and *THBD* across different cell clusters; a: *CTSD*; b: *FAH*; c: *THBD*.

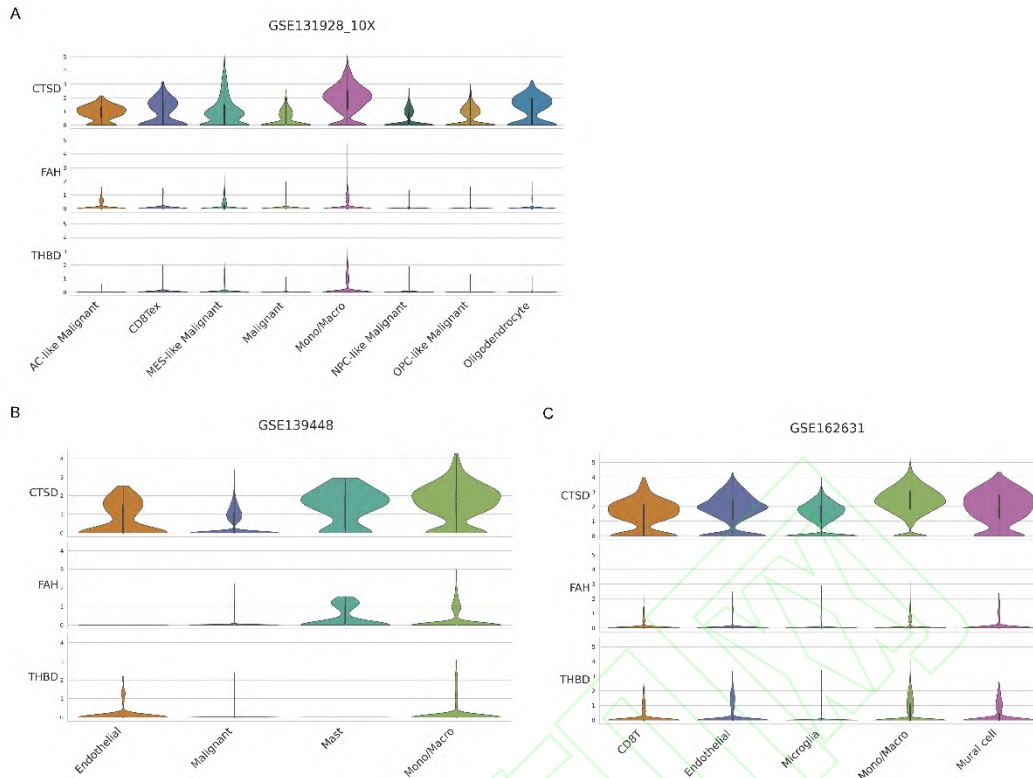


图 7 预后基因在不同细胞类型中的分布

Fig.7 Distribution of prognostic genes across different cell types

A: Violin plots of the expression patterns of *CTSD*, *FAH*, and *THBD* in eight cell types (AC-like Malignant, CD8Tex, MES-like Malignant, Malignant, Mono/Macro, NPC-like Malignant, OPC-like Malignant, Oligodendrocyte) from the GSE131928 dataset. B: Violin plots of the expression patterns of *CTSD*, *FAH*, and *THBD* in four cell types (Endothelial, Malignant, Mast, Mono/Macro) from the GSE139448 dataset. C: Violin plots of the expression patterns of *CTSD*, *FAH*, and *THBD* in five cell types (CD8T, Endothelial, Microglia, Mono/Macro, Mural cell) from the GSE162631 dataset.

2.4 GBM 中预后基因与免疫细胞浸润的相关性分析 TIMER 数据库研究了 GBM 中预后基因表达与免疫细胞浸润水平之间的相关性。*CTSD* 表达与肿瘤纯度、CD8⁺ T 细胞呈负相关 ($P < 0.05$)，与 CD4⁺ T 细胞、中性粒细胞和树突状细胞呈正相关 ($P < 0.05$, 图 8A)。*FAH* 表达与肿瘤纯度和 CD8⁺ T 细胞呈负相关 ($P < 0.05$)，与 CD4⁺ T 细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞呈正相关 ($P < 0.05$) (图 8B)。类似地，*THBD* 的表达与肿瘤纯度和 CD8⁺ T 细胞呈负相关 ($P < 0.05$)；与中性粒细胞和树突状细胞呈正相关 ($P < 0.05$) (图 8C)。这些结果表明 3 个预后基因 (*CTSD*、*FAH* 和 *THBD*) 与 GBM 微环境中的免

疫浸润相关。

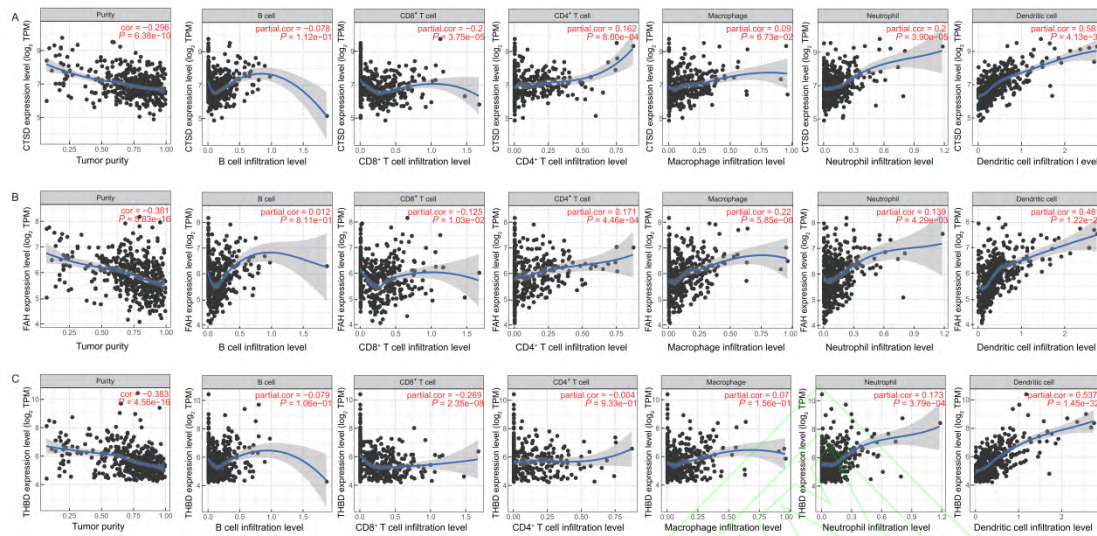


图 8 GBM 中预后基因表达与免疫浸润的相关分析

Fig.8 Correlation between prognostic gene expression and immune infiltration in GBM

A-C: Correlations between *CTSD*, *FAH*, and *THBD* expression and tumor purity, B cells, CD8⁺ T cells, CD4⁺ T cells, macrophages, neutrophils, and dendritic cells, respectively, examined using the TIMER database. Scatter plots show correlation coefficients and P values.

2.5 *FAH* 在 GBM 中的表达特征分析 为了探索 *FAH* 的临床相关性，使用 TCGA 数据集检测了其在不同 GBM 患者亚组中的表达情况。*FAH* 在原发性 GBM 组织中的表达高于正常脑组织 ($P < 0.001$)，图 9A)。分年龄层分析结果表明，*FAH* 在不同年龄组 (21~40、41~60、61~80 和 >80 岁) 中持续上调 ($P < 0.05$)，图 9B)。此外，与正常组织相比，男性和女性 GBM 患者的 *FAH* 表达均升高 ($P < 0.001$)，而男性和女性 GBM 患者中 *FAH* 的表达并无明显差异 (图 9C)。TP53 突变组和 TP53 非突变组的 *FAH* 表达水平均高于正常样本 ($P < 0.001$)，且 TP53 突变肿瘤中的 *FAH* 表达最高 ($P < 0.05$)，图 9D)。HPA 数据库中的免疫组化分析进一步证实，与正常脑组织相比，GBM 组织中 *FAH* 蛋白表达增加 (图 9E)。这些结果表明，*FAH* 在 GBM 中高表达，并可能与肿瘤进展相关。

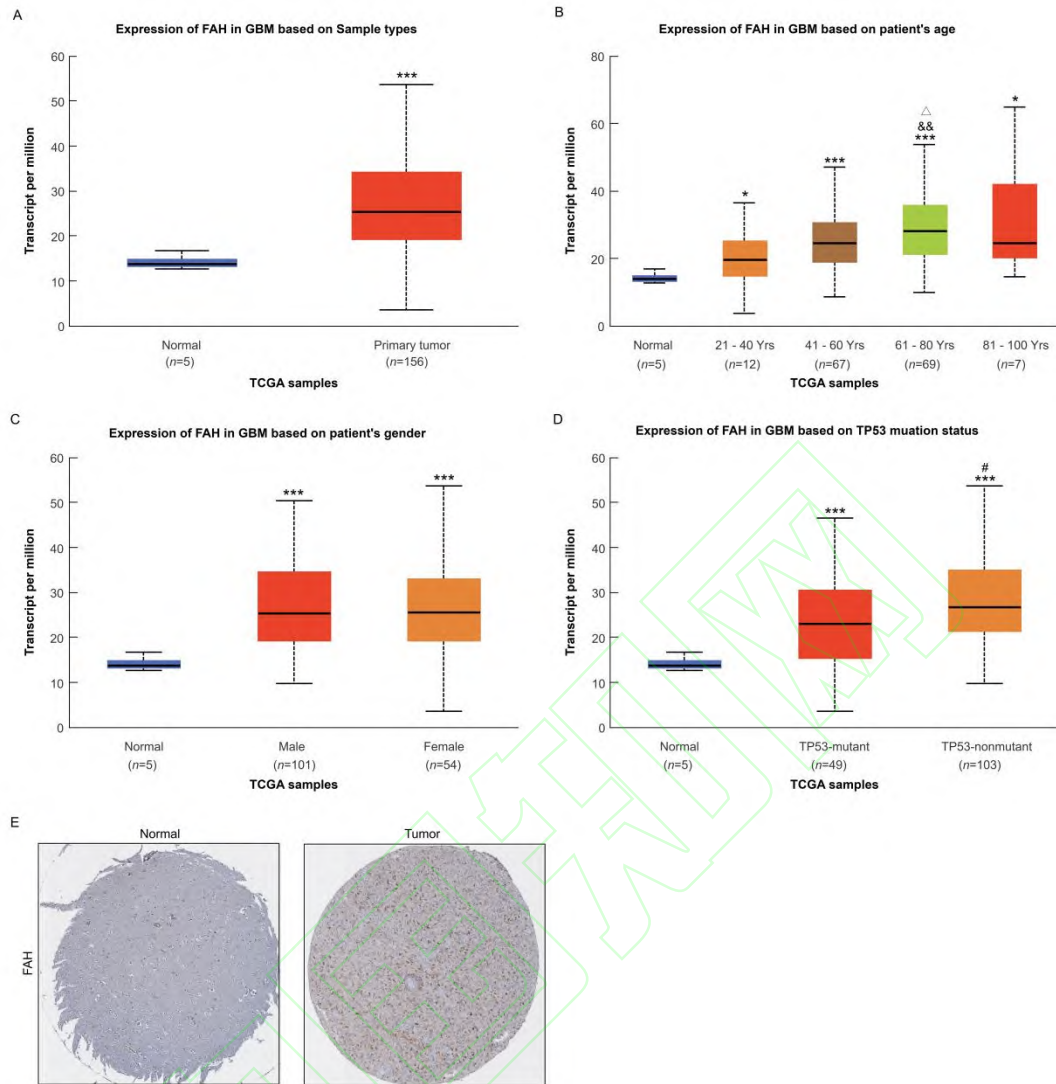


图 9 *FAH* 在 GBM 中的临床表达特征分析

Fig.9 Analysis of the clinical expression characteristics of *FAH* in GBM

A: Boxplot showing *FAH* expression in normal brain tissue and primary GBM samples; B: *FAH* expression in different age groups (21-40 years, 41-60 years, 61-80 years, and >80 years); C: *FAH* expression in male and female patients and normal tissue; D: *FAH* expression in GBM tissue with and without TP53 mutations; E: Representative immunohistochemistry (IHC) images showing *FAH* protein expression in normal brain and GBM tissue; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Normal group; # $P < 0.05$ vs TP53-mutant group; && $P < 0.01$ vs 21 - 40 Yrs group; $\Delta P < 0.05$ vs 41-60 Yrs group.

2.6 *FAH* 沉默对 GBM 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响 为了验证 *FAH* 在 GBM 中的致癌潜力，体外细胞实验中通过 qPCR 和 Western blot 分析了 *FAH* 的表达。结果显示，与正常人星形胶质细胞 (NHA) 相比，GBM 细胞系中的 *FAH* 表达升高，尤其是在 U87 和 T98G 细

胞的表达最高 ($P < 0.05$, 图 10A-10C)。使用慢病毒 shRNA 沉默了 U87 和 T98G 细胞中的 *FAH* 表达后, qPCR 和 Western blot 均证实 *FAH* 在 mRNA 和蛋白质水平上被有效敲低 ($P < 0.05$, 图 10D-F)。CCK-8 检测结果显示, 与 shNC 组相比, sh*FAH* 组 U87 和 T98G 细胞的增殖活性降低, 两组之间差异具有统计学意义 ($P < 0.001$, 图 10G、10H)。同样, Transwell 实验表明, sh*FAH* 组的迁移和侵袭数量少于 shNC 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 11A-D)。上述结果提示, *FAH* 表达下调与 GBM 细胞增殖及迁移侵袭能力的降低有关。

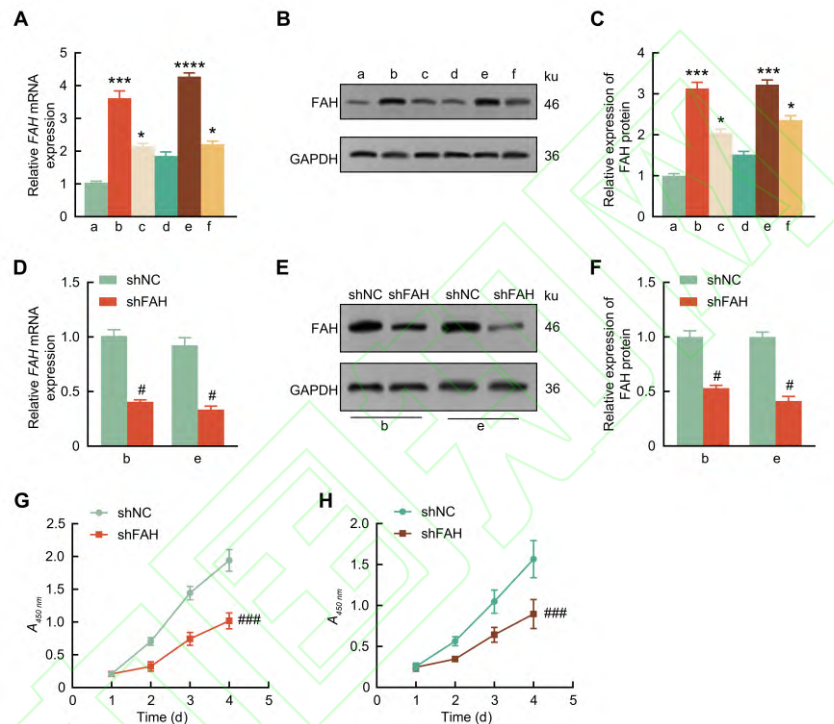


图 10 *FAH* 在 GBM 细胞系中的表达及其对细胞增殖的影响

Fig.10 *FAH* expression in GBM cell lines and its effects on cell proliferation

A: qPCR analysis of *FAH* mRNA expression in normal human astrocytes (NHA) and GBM cell lines (U87, HS683, U251, T98G, and SHG44); B: Western blot analysis of *FAH* protein levels in NHA and GBM cell lines; C: Quantitative expression of *FAH* protein, using GAPDH as an internal control; D-F: Validation of *FAH* knockdown efficiency in U87 and T98G cells by qPCR and Western blot; G,H: CCK-8 assays showing changes in U87 and T98G cell proliferation after *FAH* knockdown; a: NHA group; b: U87 group; c: HS683 group; d: U251 group; e: T98G group; f: SHG44 group; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ vs NHA group; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs shNC group.

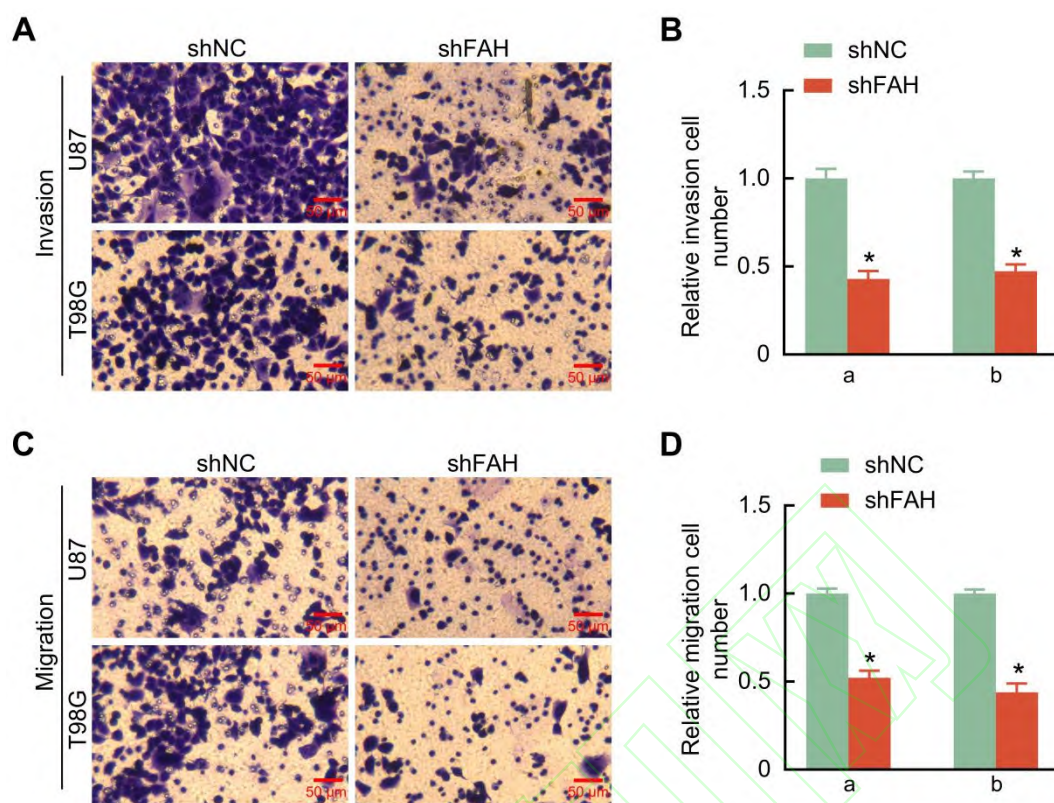


图 11 *FAH* 敲低抑制 GBM 细胞的侵袭和迁移

Fig.11 *FAH* knockdown inhibited the invasion and migration of GBM cell

A: Representative images of transwell invasion assays of U87 and T98G cells transfected with shNC or shFAH; Scale bar = 50 μm ; B: Quantitative analysis of the number of invasive cells showed a significant decrease in invasive cell numbers after *FAH* knockdown; C: Representative images of migration assays of U87 and T98G cells; Scale bar = 50 μm ; D: Quantitative analysis of migrating cells showed that *FAH* knockdown significantly inhibited GBM cell migration; a: U87 group; b: T98G group; * $P < 0.05$ vs shNC group.

2.7 *FAH* 调控 GBM 中的 PI3K/AKT/mTOR 信号通路 PI3K/Akt/mTOR 信号通路是 GBM 发生发展的核心驱动因素。该通路的激活与 GBM 不良预后显著相关，其下游分子（如磷酸化 Akt、mTOR）可作为潜在预后标志物。为了探究 *FAH* 介导致癌作用的分子机制，通路富集分析显示 *FAH* 表达与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路激活呈正相关（相关系数 $r=0.409$, $P=1.54e-07$; 图 12A）。与此预测一致，Western blot 分析显示，与 shNC 组相比，shFAH 组 GBM 细胞中 p-PI3K、p-AKT、p-4EBP1 和 p-S6 水平降低（ $P < 0.05$ ），而这些分子的总蛋白水平保持不变（图 12B-12F）。这些结果表明，*FAH* 至少部分通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路来促进 GBM 进展。

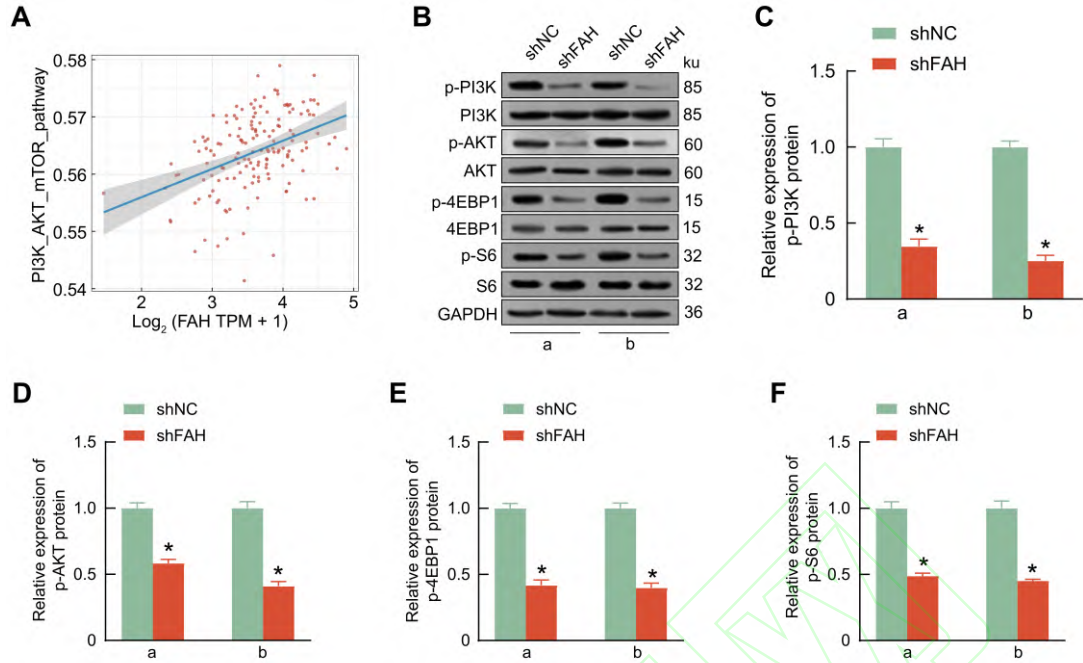


图 12 *FAH* 调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路

Fig.12 *FAH* regulated the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

A: Spearman correlation analysis between *FAH* gene expression and the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. B: Western blot analysis of phosphorylated and total PI3K, AKT, 4EBP1, and S6 proteins in U87 and T98G cells after *FAH* knockdown. C-F: Quantitative analysis of phosphorylated PI3K, AKT, 4EBP1, and S6 protein expression; a: U87 group; b: T98G group; * $P < 0.05$ vs shNC group.

2.8 *FAH* 敲低可降低体内 GBM 肿瘤生长 为了进一步验证 *FAH* 在体内的致癌作用, 使用稳定转染 sh*FAH* 或 shNC 的 U87 细胞建立了异种移植小鼠模型。与 shNC 组相比, *FAH* 沉默细胞组的肿瘤生长速度明显减慢 (图 13A)。定量分析显示, sh*FAH* 组的肿瘤重量和肿瘤体积均小于 shNC 组 ($P < 0.001$, 图 13B、13C)。这些结果证明了沉默 *FAH* 在体内抑制 GBM 的肿瘤生长。

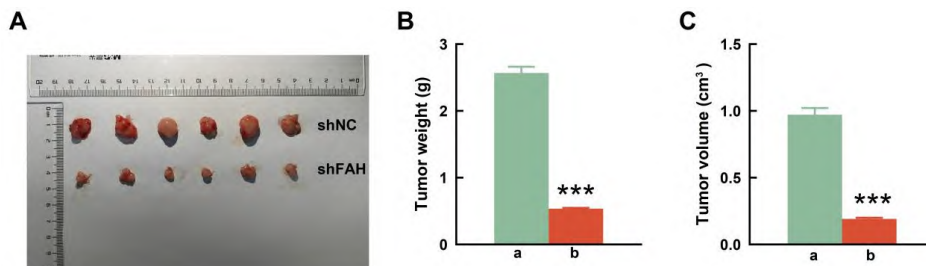


图 13 *FAH* 敲低抑制 GBM 细胞体内肿瘤的大小和重量

Fig.13 Knockdown of *FAH* reduced the size and weight of GBM tumors *in vivo*

A: Representative images of xenograft tumors derived from U87 cells transfected with shNC or shFAH; B: Tumor weight analysis showing significantly lower tumor burden in the shFAH group compared with shNC; C: Tumor volume measurements confirming that FAH knockdown markedly inhibited tumor growth *in vivo*; a: shNC group; b: shFAH group; *** $P < 0.001$ vs shNC group.

3 讨论

本次研究，通过整合了 TCGA 和 GEO 数据集，以识别与 GBM 进展相关的免疫相关基因，确定了 CTSD、FAH 和 THBD 是与患者生存和 TME 中免疫浸润显著相关的关键预后基因。其中，FAH 在 GBM 样本中表现出最一致的上调，并且与年龄和 TP53 突变状态等临床特征密切相关。功能分析进一步表明，FAH 在体外促进 GBM 细胞增殖、迁移和侵袭，而在体内抑制其表达则抑制肿瘤生长。进一步实验证实 FAH 至少部分通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路发挥其致癌作用。这些发现为 GBM 的分子基础提供了新的见解，并提示 FAH 可作为潜在的预后生物标志物。

采用 WGCNA 方法，对 3 个数据集中的交集基因进行了共表达网络分析，发现绿松石模块与 TME 特征显著相关。进一步富集分析发现模块基因主要富集于炎症反应、免疫细胞趋化以及趋化因子信号通路等过程。生存分析从该模块中筛选出 5 个与 GBM 预后密切相关的基因（HK3、THBD、CTSD、FAH 和 FCN3），其中 CTSD、FAH、HK3 和 THBD 在 GBM 样本中显著高表达。基于 LASSO Cox 回归建立的三基因风险模型（THBD、CTSD 和 FAH），在 ROC 曲线中表现出较好的预测价值。这些免疫相关基因已被证实在 GBM 的发生发展中发挥重要作用。例如，研究表明 CTSD 的抑制通过减弱自噬来增强 GBM 细胞的放射敏感性^[7]。CTSD 的高表达可导致 GBM 较差的预后，并促进肿瘤细胞的迁移、侵袭和恶性进展^[8]。HK3 在 GBM 中表达上调，与预后不良相关，且 HK3 高表达组富集于适应性免疫反应、趋化因子信号通路及细胞因子-细胞因子受体相互作用^[9]。HK3 还可通增加胶质瘤微环境中的免疫细胞浸润显著加剧肿瘤免疫抑制微环境^[10]。另外，THBD 通过 SPI1 介导的转录激活增强了替莫唑胺（TMZ）耐药性和糖酵解，从而促进了 GBM 细胞的存活与恶性进展^[11]。相比之下，目前 FAH 与 GBM 之间的具体分子机制仍不明确，这为进一步探索其在肿瘤进展和免疫调节中的潜在作用提供了基础。

GBM 是一种高度侵袭性和致死率极高的中枢神经系统肿瘤，其复杂的 TME 在疾病的发生发展中发挥关键作用^[12-13]。TME 不仅塑造了 GBM 的生物学特征，还深刻影响患者的临床表现、治疗反应和生存预后^[14]。肿瘤相关巨噬细胞和小胶质细胞（tumor-associated

macrophages and microglia, TAMs) 被证实是 GBM 的主要免疫细胞群, 参与免疫抑制。单细胞技术可揭示 TAMs 异质性和功能, 为开发 TAMs 靶向治疗提供新方向^[15]。基于单细胞 RNA 测序还揭示复发性 GBM 的耐药机制, 其特征包括干性基因上调、小胶质细胞减少、血管内皮生长因子 A (VEGFA) 增加和 MGMT 通路激活, 提示肿瘤异质性与耐药性密切相关^[16]。为了进一步明确与预后相关基因在不同细胞群体中的分布特征, 本次研究对 *CTSD*、*FAH* 和 *THBD* 进行了单细胞水平的表达分析。结果显示 *CTSD*、*FAH* 和 *THBD* 在 GBM TME 的不同细胞群 (尤其是恶性细胞和免疫细胞) 中差异表达。其中, *CTSD* 在部分恶性细胞和巨噬细胞中持续高表达, *FAH* 主要在单核/巨噬细胞和肥大细胞中上调, 而 *THBD* 则集中分布于内皮细胞和单核/巨噬细胞。免疫浸润分析进一步揭示, 3 个基因的表达水平均与肿瘤纯度呈负相关, 并与巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞显著正相关; 同时, *CTSD* 和 *FAH* 的表达与 CD8⁺ T 细胞负相关, 而 *THBD* 还与 B 细胞和 CD4⁺ T 细胞呈负相关。这些结果提示, *CTSD*、*FAH* 和 *THBD* 可能在 GBM 的免疫微环境调控中发挥重要作用。

已有研究^[17]表明, GBM 的复杂分子特征主要受 PI3K/AKT/mTOR、Wnt 及 NF- κ B 等关键信号通路的调控。其中, PI3K/AKT/mTOR 通路在 GBM 中尤为突出, 其异常激活不仅推动了细胞周期进展 (如促进 Cyclin D1 与 CDK 结合, 加速 G₁-S 期转变), 从而维持肿瘤细胞的持续增殖, 还通过下游 mTOR 的激活促进细胞生长和分裂。该通路还能通过调控蛋白质、核苷酸和脂质的合成, 维持肿瘤细胞的高活性^[18]。与此同时, PI3K/AKT/mTOR 通路上调与糖酵解通量增加是 GBM 典型的代谢特征, 这些改变在驱动肿瘤快速生长的同时, 也与对常规治疗的耐药性密切相关^[18]。天然产物也可能成为干预该通路的潜在手段, 例如, 传统中药通关藤中分离出来的活性成分通关藤苷 H 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 降低 GBM 细胞的活性, 诱导细胞周期停滞和凋亡, 同时抑制细胞迁移^[19]。

FAH 是酪氨酸分解代谢的关键酶, 其突变可导致遗传性酪氨酸血症 I 型并增加肝肾损伤风险^[20]。尽管 *FAH* 在代谢性疾病中已有报道, 但其在 GBM 中的作用及潜在机制此前尚未得到系统性研究。本次研究首次发现 *FAH* 在 GBM 数据样本中显著上调, 沉默 *FAH* 有效抑制 GBM 细胞的恶性表型。进一步的分析发现 *FAH* 与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的激活呈正相关。Western blot 结果一致表明, *FAH* 敲低显著降低了 PI3K、AKT、4EBP1 和 S6 的磷酸化水平, 而总蛋白水平保持不变, 这表明 *FAH* 至少部分通过激活 PI3K/AKT/mTOR 级联来促进 GBM 进展。异种移植小鼠模型进行的体内实验进一步验证了这些发现。与对照组相比, 在 U87 细胞中稳定敲低 *FAH* 可显著降低肿瘤生长速度、肿瘤体积和肿瘤重量。总而

言之，这些结果表明 *FAH* 在 GBM 中高表达，通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路促进肿瘤进展，并促进体内肿瘤生长。

本研究存在若干局限性。首先，尽管我们发现 *FAH* 敲低可抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路活性，但尚未通过 *FAH* 过表达或通路激活剂/抑制剂进行双向验证，因此无法完全证明其直接调控作用。其次，*FAH* 与免疫细胞浸润的相关性仅基于 scRNA-seq 和 TIMER 分析，缺乏功能性实验验证其在免疫调控中的作用。第三，*FAH* 作为酪氨酸代谢酶，其代谢功能可能影响 GBM 进展，但本研究未探索其代谢活性及潜在机制。最后，体内实验仅使用 U87 细胞系，该细胞系存在来源争议，未来需使用多种细胞系或原代细胞进一步验证结果。这些局限性提示，未来研究需通过更全面的实验和机制分析来深入阐明 *FAH* 在 GBM 中的多重作用。

综上所述，*FAH* 在 GBM 组织和细胞系中高表达，并与 TME 和患者预后相关。*FAH* 可能部分通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路影响 GBM 体外恶性表型和体内肿瘤生长。研究提示 *FAH* 可作为 GBM 中有前景的生物标志物。

参考文献

- [1] Verdugo E, Puerto I, Medina M Á. An update on the molecular biology of glioblastoma, with clinical implications and progress in its treatment[J]. *Cancer Commun*, 2022, 42(11): 1083-111. doi:10.1002/cac2.12361.
- [2] Sipos D, Raposa B L, Freihat O, et al. Glioblastoma: clinical presentation, multidisciplinary management, and long-term outcomes[J]. *Cancers*, 2025, 17(1): 146. doi:10.3390/cancers17010146.
- [3] Smith C J, Perfetti T A, Chokshi C, et al. Risk factors for glioblastoma are shared by other brain tumor types[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2024, 43: 9603271241241796. doi:10.1177/09603271241241796.
- [4] Afrashteh Nour M, Rahmati-Yamchi M, Shimia M, et al. Emerging insights into the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and non-coding RNA-mediated drug resistance in glioblastoma[J]. *Curr Mol Med*, 2025, 25(6): 710-22. doi:10.2174/0115665240309647240516042716.
- [5] Agosti E, Panciani P P, Zeppieri M, et al. Tumor microenvironment and glioblastoma cell interplay as promoters of therapeutic resistance[J]. *Biology*, 2023, 12(5): 736. doi:10.3390/biology12050736.
- [6] Wen B, Liu M, Qin X, et al. Identifying immune cell infiltration and diagnostic biomarkers in heart failure and osteoarthritis by bioinformatics analysis[J]. *Medicine*, 2023, 102(26): e34166. doi:10.1097/MD.00000000000034166.
- [7] Zheng W, Chen Q, Wang C, et al. Inhibition of Cathepsin D (CTSD) enhances radiosensitivity of glioblastoma cells by attenuating autophagy[J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(6): 651-60. doi:10.1002/mc.23194.
- [8] Hsieh Y H, Tsai J P, Yu C L, et al. Overexpression of lipocalin-2 inhibits proliferation and

- invasiveness of human glioblastoma multiforme cells by activating ERK targeting cathepsin D expression[J]. *Biology*, 2021, 10(5): 390. doi:10.3390/biology10050390.
- [9] Yang Y, Fu X, Liu R, et al. Exploring the prognostic value of HK3 and its association with immune infiltration in glioblastoma multiforme[J]. *Front Genet*, 2023, 13: 1033572. doi:10.3389/fgene.2022.1033572.
- [10] Li S, Li Z, Wang X, et al. HK3 stimulates immune cell infiltration to promote glioma deterioration[J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1): 227. doi:10.1186/s12935-023-03039-w.
- [11] Dong J, Peng Y, Zhong M, et al. Implication of lncRNA ZBED3-AS1 downregulation in acquired resistance to Temozolomide and glycolysis in glioblastoma[J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 938: 175444. doi:10.1016/j.ejphar.2022.175444.
- [12] Sharma P, Aaroe A, Liang J, et al. Tumor microenvironment in glioblastoma: current and emerging concepts[J]. *Neurooncol Adv*, 2023, 5(1): vdad009. doi:10.1093/oaajnl/vdad009.
- [13] 李鑫, 刘畅, 薛春红, 等. 胶质瘤中 LINC01152 的表达及其对胶质瘤细胞恶性生物学行为的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(4): 622-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.017.
- Li X, Liu C, Xue C H, et al. Expression of LINC01152 in glioma and its effect on malignant biological behavior of glioma cells[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(4): 622-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.017.
- [14] Crivii C B, Boca A B, Melincovici C S, et al. Glioblastoma microenvironment and cellular interactions[J]. *Cancers*, 2022, 14(4): 1092. doi:10.3390/cancers14041092.
- [15] Khan F, Pang L, Dunterman M, et al. Macrophages and microglia in glioblastoma: heterogeneity, plasticity, and therapy[J]. *J Clin Invest*, 2023, 133(1): e163446. doi:10.1172/JCI163446.
- [16] Wu H, Guo C, Wang C, et al. Single-cell RNA sequencing reveals tumor heterogeneity, microenvironment, and drug-resistance mechanisms of recurrent glioblastoma[J]. *Cancer Sci*, 2023, 114(6): 2609-21. doi:10.1111/cas.15773.
- [17] Pouyan A, Ghorbanlo M, Eslami M, et al. Glioblastoma multiforme: insights into pathogenesis, key signaling pathways, and therapeutic strategies[J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1): 58. doi:10.1186/s12943-025-02267-0.
- [18] Barzegar Behrooz A, Talaie Z, Jusheghani F, et al. Wnt and PI3K/Akt/mTOR survival pathways as therapeutic targets in glioblastoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3): 1353. doi:10.3390/ijms23031353.
- [19] Dong J, Qian Y, Zhang W, et al. Tenacissoside H repressed the progression of glioblastoma by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 968: 176401. doi:10.1016/j.ejphar.2024.176401.
- [20] Chi H, Gan C, Jiang Y, et al. The compound heterozygous mutations of c.607G>a and c.657delC in the FAH gene are associated with renal damage with hereditary tyrosinemia type 1 (HT1)[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2023, 11(1): e2090. doi:10.1002/mgg3.2090.